# 研究 mir-219 下调 TGFBR2 影响 ENDMT 途径抑制急性心肌梗死

郭义威[△]　王松涛　崔卫刚

（新乡医学院人体解剖学教研室，河南 新乡 453003）

**摘要 目的** 本研究主要是 mir-219 通过对 TGFBR2 调控机制，介导 ENDMT 途径缓解急性心肌梗死的发展。**方法** qRT-PCR 检测 AMI 患者及 AMI 小鼠血清中 miR-219 的表达量；过 microRNA 靶基因数据库 TargetScan 进行筛选预测；荧光素酶报告基因法及 qRT-PCR 分析 TGFBR2 与 miR-219 的调控机制；我们通过心脏超声心动图检测 AMI 小鼠心肌注射 miR-219 慢病毒 4 周后的血分数（LVEF）；采用 qRT-PCR 检测心肌注射 miR-219 慢病毒的 AMI 小鼠中 Nppa 的 mRNA 的表达量；通过 Masson’s trichrome 染色法检测小鼠四周后左心室纤维化变化；使用α平滑肌肌动蛋白（α-SMA）对小鼠左室切片进行免疫组化分析；通过 Western blot 检测 P-smad2、P-smad3 及 TGFBR2 缺氧诱导蛋白磷酸化的表达水平。**结果** miR-219 对 AMI 有调控作用；miR-219 可抑制 TGFBR2 的 mRNA 表达，而 miR-219 inhibitor 可以抑制这种下调效果，miR-219 对 TGFBR2 具有抑制调控性；miR-219 可抑制急性心肌梗死的进程，促进梗死心肌功能的恢复；miR-219 能促进 AMI 小鼠心肌组织血管的新生和成熟，最终心脏收缩能力上升，心功能恢复；miR-219 能抑制 TGFBR2 抑制 EndMT 途径，导致缓解 AMI 的病理进程。**结论** miR-219 能通过抑制 TGFBR2 影响 EndMT 途径，心肌纤维化减少，促进血管的新生和成熟，心功能恢复，抑制 AMI 的病理发展。

**关键词：**AMI；miR-219；TGFBR2；EndMT

## Inhibition of acute myocardial infarction by miR-219 on ENDMT pathway by targeting TGFBR2

Guo Yi-wei[△]　Wang Song-tao　Cui Wei-gang

（Department of Anatomy, Xinxiang Medical University, He'nan Xinxiang 453003, China.）

**Abstract Objective** In this study, miR-219 mediated the development of acute myocardial infarction through the regulation mechanism of TGFBR2 and the ENDMT pathway. **Methods** the expression of miR-219 in the serum of AMI patients and mice was detected by qRT-PCR. The target gene of miR-219 was screened in gene database

of microRNA. The regulatory mechanism of TGFBR2 and miR-219 was examined by luciferase reporter gene and qRT-PCR.The blood scores (LVEF) of AMI mice were measured 4 weeks after myocardial injection of miR-219 lentivirus (LVEF) by cardiac echocardiography. The mRNA expression of Nppa in AMI mice injected with miR-219 lentivirus was detected by qRT-PCR. The changes of left ventricular fibrosis in mice were detected by Masson's trichrome staining. Immunohistochemical analysis of the left ventricular section of mice was performed using spla-sma. Expression levels of p-smad2, p-smad3 and TGFBR2 hypoxia induced protein phosphorylation were detected by Western blot. **Results** miR-219 can regulate AMI. miR-219 inhibited the mRNA expression of TGFBR2, while miR-219 inhibitor inhibited the down-regulation effect. miR-219 can inhibit the process of acute myocardial infarction and promote the recovery of myocardial function of infarction. miR-219 can promote the angiogenesis and maturity of the myocardial tissue of AMI mice, and eventually the cardiac contractility increases and the cardiac function recovers. miR-219 can inhibit the inhibition of EndMT pathway by TGFBR2, leading to the alleviation of the pathological process of AMI. **Conclusion** miR-219 can inhibit the EndMT pathway by inhibiting TGFBR2, reduce myocardial fibrosis, promote angiogenesis and maturity, recover cardiac function and inhibit the pathological development of AMI.

**Keywords:** AMI; miR-219; TGFBR2; EndMT



**1．前言**

在冠心病的诸多类型中，急性心肌梗死(Acute Myocardial Infarction，AMI)是最危重的类型之一。在冠状动脉粥样硬化的基础上，不稳定的粥样斑块溃破、出血、管腔内血栓形成、冠状动脉的急性闭塞，导致部分心肌发生持久性缺血而发生的局部坏死[1]。AMI 发病突然，病情进展迅速，常危及生命，死亡率高，近 10 年来我国居民患有 AMI 的患者数量呈逐年上升趋[2]。心肌结构组织内的胶原纤维异常积累，而导致心肌内胶原的浓度明显升高或是胶原容积分数(collagen volume fraction，CVF)增多，各种类型的胶原排序混乱及比例失衡的现象叫做心

肌纤维化(myocardial fibrosis，MF)[3]。内皮间充质转化（endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT）即内皮细胞在促成纤维刺激下可获得成纤维细胞样表型。许多研究指出 EndMT 可引起冠心病、急性心肌梗死和心肌纤维化的进展[4]。EndMT 中，内皮细胞脱落于血管内膜(位于细胞组织层内)，同时通过入侵皮下组织而进行细胞迁移。间叶细胞表型是以获得间叶细胞标志物如 SMA、N-cadherin，失去内皮细胞标志物 CD31、VE-cadherin。同时，内皮细胞的细胞间连接消失并获得迁移和侵袭性[5]。一些研究已经证实 EndMT 在心脏纤维化的作用[6]。比如说 Zeisberg etal．进行谱系分析来探索心肌纤维化中成纤维细胞的起源[7]。通过使心脏承受 5 天主动脉狭窄所致的压力超负荷来诱导心脏纤维化。TGF-β可以诱导 EndMT，在 Smad 依赖性途径，TGFBR2-ALK5、磷酸化 Smad2、Smad3 参与其中。在鼠的胚胎干细胞分化的内皮细胞中，TGF-β通过激活 Smad、MEK、p38 MAPK 并抑制 Snail 1 来参与 EndMT[8]。TGF-β信号传导需要 TGFBR1 和 TGFBR2 共同参与，并且 TGFBR1 需要 TGFBR2 的参与才能激活并与 TGF-β结合从而进一步激活下游通路，引发一系列纤维化效应。因此，TGFBR2 在 TGF-β信号通路中具有重要作用[9]。目前已发现多种 miRNA 与急性急性心肌梗死有关。且有大量研究支持 miRNAs 与冠心病发生发展相关，尤其是在急性急性心肌梗死中，无论在人还是动物模型中的研究都多次证明这些 miRNA 可能具有早期诊断急性急性心肌梗死的能力，并为其治疗提供新的方向[10, 11]。所以本研究主要是 miR-219 通过对 TGFBR2 调控机制，介导 ENDMT 途径缓解急性心肌梗死的发展可能会成为 AMI 诊疗的新方向。

## 2. 方法

### 2.1 研究对象

收集 2014 年 5 月至 2018 年 4 月在我院就诊的 AMI 患者 118 例，其中男性 77 例，女性 41 例。选取同期 95 名健康体检者为健康对照组。所有参与者均知情同意，并签署知情同意书。针对纳入的研究对象，采集肘静脉血 5-6mL；待血清析出后以 1000g 离心 10 min，取上层血清保存至-80 ℃冰箱待检测。

### 2.2 细胞培养和转染

人主动脉内皮细胞（human aortic endothelial cells，HAECs））使用含 10%胎

牛血清的 DMEM 培养基（培养基中含链霉素、青霉素，浓度分别为 100U/ml、100U/ml）。于 37 ℃、5%$CO_2$ 培养箱中培养，1-2 d 传代 1 次，取 2-4 代细胞实验。按照说明书分别转染 miR-219 mimics 和 negative control miRNA mimics 进 HAECs 细胞。

**2.3 构建 AMI 小鼠模型**

雄性C57/BL6小鼠随机分为假手术组（12只），AMI组（24只），AMI+ miR-219组（24只）。AMI组小鼠用2％水合氯醛(100 mg/kg)腹腔注射麻醉。胸骨左缘第2-4肋开胸，识别前降支走行范围，7/0滑线结扎左前降支，当结扎区域颜色转为苍白，心电图示波为急性心肌梗死表现时确认模型构建成功。假手术组小鼠开胸但不结扎左冠状动脉。其余步骤同AMI组。AMI+ miR-219组小鼠采用miR-219 mimics慢病毒进行心肌局部注射。

**2.4 心脏功能检测**

术后 2 周，10%水合氯醛腹腔注射对小鼠进行麻醉，然后心脏彩超检查各组小鼠并记录左室射血分数（LVEF）。

**2.5 qRT-PCR 检测**

采用 Trizol 法提取总 RNA，实验按照 Trizol 试剂盒说明书中步骤进行。将提取到的总 RNA 按照反转录试剂盒 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit（#K1622）说明书，进行 RNA 反转录，合成 cDNA，反转录体系见表 1，反应条件为 25 ℃，5 min；42 ℃，60 min；70 ℃，5 min。将 cDNA 分装并放置在 -20 ℃保存备用。

表 1 反转录体系

| 成分 | 体积 |
|---|---|
| Total RNA | 2μl |
| Oligo(dT)18 Primer | 1μl |
| 5×Reaction Buffer | 4μl |
| Ribolock TM RNase Inhibitor | 1μl |
| 10 mM dNTP Mix | 2μl |
| RevertAid TM M-MuLV Reverse Transcriptase | 1μl |
| Water Neuclease-free | 9μl |

按照 qRT-PCR 试剂盒说明书进行 PCR 反应，采用β-actin 作为内参，反应体系

见表 2，反应条件为 95 ℃预变性 30 s，95 ℃，5 s，60 ℃，34s，循环 40 次，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算基因 mRNA 的相对表达量。

表 2 qRT-PCR 反应体系

| 试剂 | 体积 |
| --- | --- |
| SYBR® Premix Ex Tap TM Ⅱ | 10 μL |
| PCR Forward Primer (10um) | 0.8 μL |
| PCR Recerse Primer (10um) | 0.8 μL |
| ROX Reference Dye | 0.4 μL |
| DNA 模板 | 2 μL |
| 灭菌蒸馏水 | 6 μL |
| Total | 20 μL |

**2.6 Masson's trichrome 染色**

切取心肌标本，采用固定液固定，浸蜡包埋，固定于切片机上切片成 3-5μm 薄片，严格按照说明书采用 Masson's trichrome 染色对假手术组小鼠，AMI 组小鼠和 AMI+miR-219 组小鼠进行心肌纤维化分析。

**2.7 荧光素酶报告分析**

构建 TGFBR2 野生型 3'-UTR 荧光素酶报告基因质粒 pMIR-wt，并以 pMIR-wt 质粒为模板，利用 PCR 搭桥法（overlapping PCR）构建其潜在结合位点突变型报告基因质粒 pMIR-Mut。将 miR-219 mimics，negative control miRNA mimics 内参海肾荧光素酶以及 pMIR-wt 和 pMIR-Mut 报告基因质粒共转染进 HAECs 中，在细胞培养箱中培养 36 h 后收取细胞液，按照双荧光素酶报告基因试剂盒 TransDetect Double-Luciferase Reporter Assay Kit 说明书采用荧光检测仪测定荧光素酶活性。

**2.8 Western Blot 检测**

采用含 50 mM Tris-HC1 (pH 7.4), 150 mM NaC1, 0.5%脱氧胆酸钠，0.1% SDS 和蛋白酶抑制剂及 1 mM 苯甲基磺酰氟的 RIPA 裂解液分离蛋白质。通过 SDS-PAGE 凝胶进行电泳，进行电转 PVDF 膜后，采用 5%脱脂奶粉封闭 2 h 后，进行一抗 P-smad2（购自 CST 公司，货号 18338T，比例 1:1000），P-smad3（购自 CST 公司，货号 9520T，比例 1:1000），TGFBR2（购自 CST 公司，货号 794245，

比例 1:1000)孵育，4℃ 过夜；TBST 清洗 10 min×3 次，摇床；二抗采用 HRP-linked Antibody 以 1:1000 比例室温孵育 2 h，TBST 清洗 10 min×3 次，摇床；ECL 发光，采用 Tanon4500 全自动化学发光图像分析系统进行显影分析。

**3. 统计学方法**

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析，计量资料用（$\bar{x} \pm s$）表示，两组样本均数比较采用 t 检验，P＜0.05 为差异有统计学意义。

**4. 结果**

**4.1 AMI 患者及 AMI 小鼠血清中 miR-219 的表达量**

AMI 患者血清中 miR-219 的表达量相比正常组显著降低（Fig. 1A），AMI 小鼠血清中 miR-219 表达量与假手术小鼠相比显著呈现低表达（Fig. 1B）。

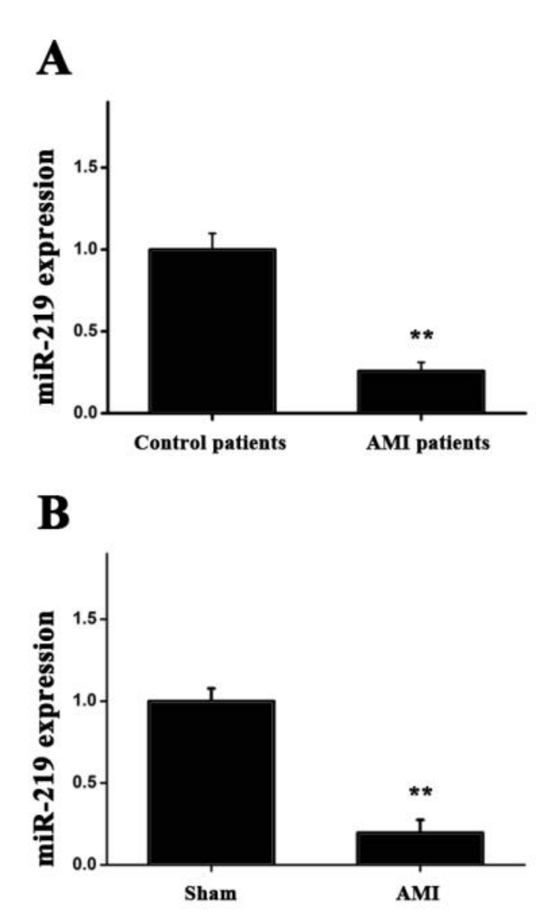



**Fig.1 AMI 患者及 AMI 小鼠血清中 miR-219 的表达量**(A) AMI 患者组与正常组血清中 miR-219 的相对表达量；(B) AMI 小鼠组与假手术小鼠组血清中 miR-219 的相对表达量

**Fig.1 Expression of miR-219 in serum of AMI patients and AMI mice. (A)**

**Relative expression of miR-219 in serum of AMI patients and normal group; (B) Relative expression of miR-219 in serum of AMI mice and sham-operated mice**

注：**, 表示 P<0.01，差异具有统计学意义

Note: **, indicating P <0.01, the difference is statistically significant

**4.2 靶基因 TGFBR2 与 miR-219 的调控作用**

我们通过 microRNA 靶基因数据库 TargetScan 进行筛选预测，确定 miR-219 的潜在靶基因为 TGFBR2（Fig.2A）。同时，构建 TGFBR2 野生型 3’-UTR 荧光素酶报告基因质粒 pMIR-WT 及突变型报告基因质粒 pMIR-Mut。将 miRNA-219 mimics，negative control miRNA mimics 以及 pMIR-WT 和 pMIR-Mut 报告基因质粒共转染进 HAECs 细胞中，双荧光素酶检测结果显示，miRNA-219 mimics 可明显抑制 pMIR-WT 质粒荧光素酶活性；而对 pMIR-Mut 荧光素酶活性无明显影响(Fig.2B)。该结果显示 miR-219 可结合 TGFBR2 的 3’-UTR 并抑制 TGFBR2 的表达。然后我们通过 qRT-PCR 检测了 NC 对照组，miR-219 mimics 转染组和 miR-219 inhibitor 转染组中 TGFBR2 的 mRNA 表达水平，发现 miR-219 mimics 转染组中 TGFBR2 的 mRNA 相比 NC 对照组显著呈现低表达，而 miR-219 inhibitor 转染组中 TGFBR2 的 mRNA 显著呈现高表达（Fig. 2C）。



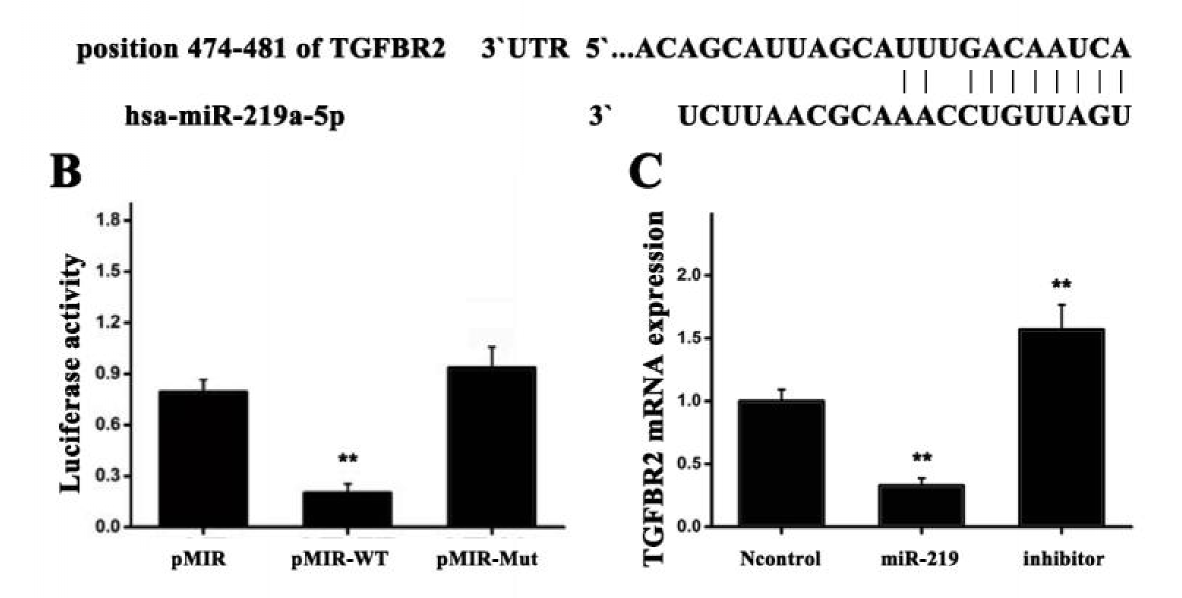




**Fig.2 靶基因 TGFBR2 与 miR-219 的调控作用(A)** 通过 TargetScan 预测 miR-219 潜在靶基因; (B)双荧光素酶检测结果; (C) qRT-PCR 检测各组 TGFBR2 的 mRNA

相对表达量Fig.2 Regulation of target gene TGFBR2 and miR-219 (A) Predicted miR-219 potential target gene by TargetScan; (B) The result of dual luciferase reporter gene assay; (C) qRT-PCR result of TGFBR2 mRNA relative expression in each groups

注：**，表示 P<0.01，差异具有统计学意义

Note: **, indicating P <0.01, the difference is statistically significant

**4.3 miR-219 对 AMI 小鼠心脏纤维化的影响**

我们推测 miR-219 会对 AMI 心功能有一定影响，我们通过对 AMI 小鼠心肌注射 miR-219 慢病毒，在 4 周后通过心脏超声心动图检测，心肌注射 miR-219 慢病毒的 AMI 小鼠比 AMI 小鼠的左心室射血分数（LVEF）恶化程度更轻微（Fig. 3A）。通过 qRT-PCR 检测心肌注射 miR-219 慢病毒的 AMI 小鼠中 Nppa 的 mRNA 的表达量也显著低于 AMI 小鼠（Fig. 3B）。上述结果显示 miR-219 可抑制 Nppa 的 mRNA 的表达导致抑制 AMI 的进程。我们采用 Masson's trichrome 染色法检测分析小鼠 4 周后左心室纤维化变化，我们发现心肌注射 miR-219 慢病毒后 AMI 小鼠比 AMI 小鼠的左心室纤维化明显减少，急性心肌梗死程度呈现恢复（Fig. 3C）。



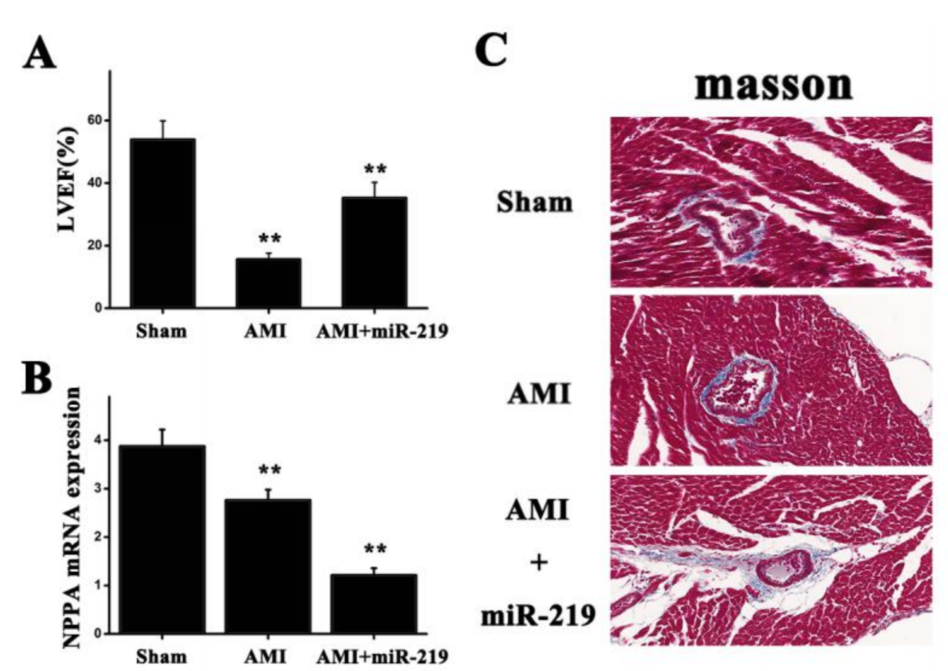



**Fig.3 miR-219 对 AMI 小鼠心脏纤维化的影响**(A)心脏超声心动图检测小鼠左心室射血分数（LVEF）恶化程度; (B) qRT-PCR 检测 Nppa mRNA 的相对表达量;

(C) 采用 Masson’s trichrome 染色法检测分析小鼠左心室纤维化变化

**Fig.3 Effect of miR-219 on cardiac fibrosis in AMI mice (A) The degree of left ventricular ejection fraction (LVEF) deterioration in mice detected by cardiac echocardiography; (B) Nppa mRNA relative expression detected by qRT-PCR; (C) Detected the left ventricular fibrosis in mice by Masson's trichrome staining**

注：**, 表示 P<0.01，差异具有统计学意义

Note: **, indicating P <0.01, the difference is statistically significant

### 4.4 AMI 小鼠模型中 miR-219 的调控机制

我们检测各处理组小鼠的心脏中血管新生的情况，使用α平滑肌肌动蛋白抗体（α-SMA）对小鼠左室切片进行免疫组化分析，我们发现 miR-219 过表达的 AMI 小鼠的心脏中α-SMA 被覆盖阳性的小血管密度远远大于 AMI 小鼠（Fig. 4）。

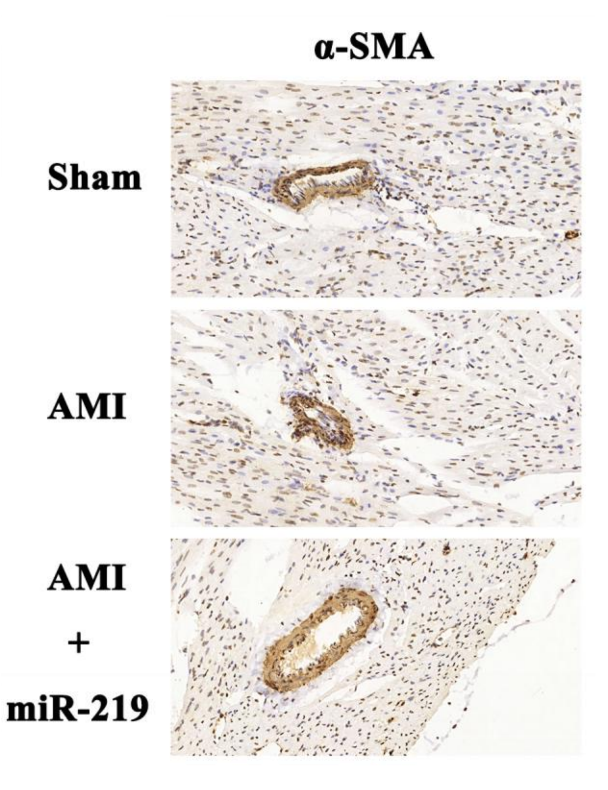



**Fig.4α-SMA 在各处理组小鼠左室切片的免疫组化结果**

**Fig.4 Immunohistochemical results of α-SMA in left ventricular sections of mice in each treatment group**

**4.5 miR-219 调控 TGFBR2 影响 EndMT 途径调节 P-smad2 及 P-smad3**

有研究表示 TGF-β 可以诱导 EndMT，在 Smad 依赖性途径，TGFBR2-ALK5、磷酸化 Smad2、Smad3 参与其中[12]。因此本研究中我们通过 Western blot 对其进行检测，我们发现 P-smad2、P-smad3 及 TGFBR2 缺氧诱导蛋白磷酸化的表达水平显著高于正常组，而 miR-219 处理组抑制了该效果，缺氧诱导蛋白磷酸化的表达水平显著低于前者，但是在 miR-219+TGFBR2 处理组中回补该抑制效果，蛋白磷酸化的表达水平显著上升。结果提示，miR-219 能抑制 TGFBR2 抑制 EndMT 途径，导致缓解 AMI 的病理进程，有抑制效果。

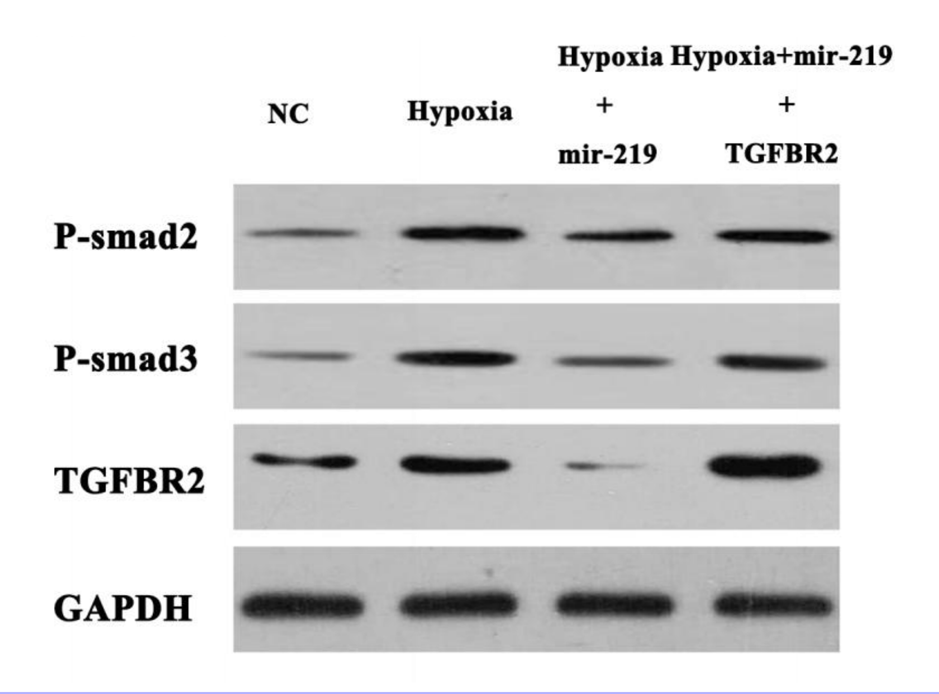



**Fig.5** P-smad2、P-smad3 及 TGFBR2 缺氧诱导蛋白磷酸化在各组中的表达水平

Fig.5 Expression levels of P-smad2, P-smad3 and TGFBR2 in each group detected by Western Blot

## 5. 讨论

急性心肌梗死（acute myocardial infarction，AMI）是指冠脉血流量因动脉粥样硬化等因素突然减少，血流受阻，使供应区域的心肌细胞无法得到养供，而后发生心肌损伤，随着范围不断扩大，进而影响心脏泵血功能，以致威胁生命。

近年以来，研究表明 miRNA 在疾病发生发展中可通过靶向调节其下游靶基因发挥作用。在多个研究领域都得到广泛重视，包括肿瘤、心血管疾病等等。已

发现多种 miRNA 在急性心肌梗死患者血液和血浆中发生改变，如 miR-1、miR-133a，miR-208b，miR-499，miR-328 等，提示循环 miRNA 在 AMI 早期诊断中具有价值[13, 14]。MicroRNAs 是一种非编码小分子 RNA，由内源基因编码，长度约为 18-22 个核苷酸，调控着人类 30%左右的基因。它通过与 3'端非翻译区不完全碱基配对来调控转录后基因的表达，在病理和生理状态下发挥重要作用。它们不但被基因内含子编码而且有时候通过特定基因编码。miRNAs 可经抑制转录或者拮抗相应的 mRNA 调控特定蛋白的表达。由于 miRNA 有多个作用靶点，因此可能有多种不同的功能。miRNAs 已被证实在几乎所有生物学进展过程中都有参与并调控基因的表达，包括细胞增殖，血管生成，细胞凋亡，细胞分化，信号传导以及应激反应等[15, 16]。miR-219 与人体多种病理生理过程具有相关性。miR-219 可调节并维持人体的昼夜节律[17]，参与阿尔兹海默症[18]、精神分裂症[19]等多种神经疾病的发生发展过程。但目前针对于 miR-219 在 AMI 发生发展过程中的调节作用尚无研究。本课题通过 qRT-PCR 检测发现，AMI 患者血清中 miR-219 的表达量低于健康正常组；且在构建的 AMI 小鼠模型血清中 miR-219 表达量亦低于假手术组小鼠。上述结果提示 miR-219 可能和 AMI 有相关的调控关系，对 AMI 的发展具有一定的影响，针对这一点需要我们进一步的研究。因此，我们还检测各处理组小鼠心脏中血管新生情况，使用α平滑肌肌动蛋白（α-SMA）对小鼠左室切片进行免疫组化分析，发现 miR-219 过表达的 AMI 小鼠的心脏中α-SMA 被覆盖阳性的小血管密度远远大于 AMI 小鼠，上述结果表明，miR-219 在 AMI 发生发展过程中具有调节作用，可促进 AMI 小鼠心肌组织血管的新生和成熟，提高心脏收缩能力，有助于心功能恢复。

TGF-β是 TGF 超家族成员之一，其他成员还包括骨形成蛋白和活化素。它们在维持组织稳态和修复中起到重要作用，同时也出现在一些肿瘤、血管疾病和纤维化疾病中。TGF-β介导的 EndMT 的分子机制涉及转录因子 Snail 家族的转录、表达[20]。TGFBR2 是 TGF-βII 型受体，其胞内含丝氨酸/苏氨酸激酶结构域，在肝脏和肾小球中密度最高。TGF-β必须通过与细胞膜上包括 TGFBR2 在内的特异性受体结合，才能发挥生物学作用[20]。目前研究已证实 TGFBR2 基因突变与马方综合征（Marfan syndrome），Loeys Deitz 主动脉瘤综合征和 Osler Weber Rendu 综合征等有关[21, 22]，但针对 TGFBR2 基因在 AMI 中的功能研究尚缺乏。本研究

通过 microRNA 靶基因数据库 TargetScan 对 miR-219 的潜在靶基因进行筛选预测，发现 TGFBR2 为 miR-219 的潜在靶基因，并通过荧光素酶报告基因法检测发现 miR-219 可结合 TGFBR2 的 3'-UTR 并抑制 TGFBR2 的表达。然后采用 qRT-PCR 法检测了 NC 对照组，miR-219 mimics 转染组和 miR-219 inhibitor 转染组中 TGFBR2 的 mRNA 表达水平，发现 miR-219 mimics 转染组中 TGFBR2 的 mRNA 相比 NC 对照组显著呈现低表达，而 miR-219 inhibitor 转染组中 TGFBR2 的 mRNA 显著呈现高表达，上述结果表明，miR-219 可抑制 TGFBR2 的 mRNA 表达，而 miR-219 inhibitor 可以抑制这种下调效果，miR-219 对 TGFBR2 具有抑制调控性。

EndMT 是内皮细胞经某种特定程序转变为拥有间质表型特性的细胞的过程。有研究显示，血管内膜层原位的内皮细胞也可从血管内膜层中分离出来，迁移到其下组织中，转化为间充质细胞或平滑肌样细胞，这一过程称为 EndMT。在 EndMT 过程中，内皮细胞从血管内膜层脱离，迁移到内膜下层组织。内皮细胞逐渐丢失其标志蛋白，如血小板内皮细胞黏附分子 1(CD31)、血管内皮钙黏蛋白，形成细长状间充质样细胞，获得间充质细胞标志蛋白，如α-SMA、神经钙黏蛋白。EndMT 在心血管发生过程中起重要作用[23, 24]。内皮细胞经 EndMT 转化为间充质心内膜垫细胞，这一过程同样出现在主动脉及下面各级动静脉的发生及成熟过程。TGF-β可以诱导 EndMT[25, 26]。在 Smad 依赖性途径，TG BR2-ALK5、磷酸化 Smad2、Smad3 参与其中。磷酸化 Smad 以及 Smad4 转入核内。Snail 家族也参与其中。在鼠的胚胎干细胞分化的内皮细胞中，TGF-β通过激活 Smad、MEK、p38 MAPK 并抑制 Snail 1 来参与 EndMT[27]。本研究中，我们通过 Western blot 对其进行检测，我们发现 P-smad2、P-smad3 及 TGFBR2 缺氧诱导蛋白磷酸化的表达水平显著高于正常组，而 miR-219 处理组抑制了该效果，缺氧诱导蛋白磷酸化的表达水平显著低于前者，但是在 miR-219+TGFBR2 处理组中回补该抑制效果，蛋白磷酸化的表达水平显著上升。上述结果提示，miR-219 能抑制 TGFBR2 抑制 EndMT 途径，导致缓解 AMI 的病理进程，有抑制作用。

大量研究表明，心肌纤维化是多种疾病如心力衰竭、高血压和心肌梗死等心血管疾病的一种基础病变，纤维化被定义为不同组织的过度增殖、硬化或者瘢痕组织的形成，同时纤维化促进细胞外基质过多堆积。尽管 EndMT 出现于先天性

条件，但它同样涉及到各种后天性的生理状态如已被广泛研究的纤维化。最近，内皮细胞已作为成纤维细胞通过 EndMT 的另一来源。Zeisberg 和他的同事揭示在心脏纤维化中接近 27-35％的成纤维细胞是来自通过共表达 CD31、FSP-1 的内皮细胞。在体外已被证实为 EndMT 抑制剂的 BMP-7 可以改善两种不同心脏病模型的大鼠的心脏纤维化，而且这些结果提示心脏纤维化与 EndMT 密切相关。本研究中我们通过对 AMI 小鼠心肌注射 miR-219 慢病毒，在 4 周后通过心脏超声心动图检测，心肌注射 miR-219 慢病毒的 AMI 小鼠比 AMI 小鼠的左心室射血分数（LVEF）恶化程度更轻微。同时，通过 qRT-PCR 检测心肌注射 miR-219 慢病毒的 AMI 小鼠中 Nppa 的 mRNA 的表达量也显著低于 AMI 小鼠。然后我们采用 Masson’s trichrome 染色法检测分析小鼠 4 周后左心室纤维化变化，我们发现心肌注射 miR-219 慢病毒后 AMI 小鼠比 AMI 小鼠的左心室纤维化明显减少，急性心肌梗死程度呈现恢复。上述结果显示 miR-219 可抑制 Nppa 的 mRNA 的表达导致抑制 AMI 的进程，促进梗死心肌功能的恢复。

综上所述，miR-219能抑制TGFBR2抑制EndMT途径，导致抑制AMI的病理进程，促进梗死心肌功能的恢复，使AMI小鼠心肌组织血管的新生和成熟，最终心脏收缩能力上升，心功能恢复。因此，mir-219下调TGFBR2抑制ENDMT途径抑制急性心肌梗死为AMI的治疗与针对于提供了新靶点。

**参考文献**

[1] 田国芳，宋玉勤，程宇彤，等. 急性心肌梗死介入治疗术后的康复运动疗法研究进展[J]. 心脏杂志, 2016, 28(4): 492-495.

[1] Tian Guofang, Song Yuqin, Cheng Yuxi, et al. Progress in rehabilitation exercise therapy after interventional therapy for acute myocardial infarction[J]. J Cardiol, 2016, 28(4): 492-495.

[2] Toltl LJ, Swystun LL, Pepler L, et a1. Protective effects of activated protein C in sepsis[J]. Thromb Haemost, 2008, 100(4): 582-592.

[3] Travers JG, Kamal FA, Bobbins J, et a1. Cardiac fihrosis: the fibroblast awakens[J]. Circ Res, 2016, 118(6): 1021-1040.

[4] 林昌建，孔辉，解卫平，等. EndMT 在血管重塑中的作用及相关信号通路[J].江苏医药,2016,42(12):1384-1386.

[4] Lin Changjian, Kong Hui, Xie Weiping, et al. The role of EndMT in vascular remodeling and related signaling pathways[J]. Jiangsu Medical Journal, 2016,42(12):1384-1386.

[5] Fidler IJ. Seed and soil revisited: contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2001, 10(2): 257-269.

[6] 张召才，严静，虞意华，等. 心肌炎小鼠心肌纤维化与心脏上皮/内皮间充质转化的关系[J].中国病理生理杂志,2011,27(9):1692-1696.

[6] Zhang Zhaocai, Yan Jing, Qi Yihua, et al. Relationship between myocardial fibrosis and cardiac epithelial/endothelial mesenchymal transition in myocarditis mice[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2011, 27(9): 1692-1696.

[7] Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis[J]. Nat Med, 2007, 13(8): 952-961.

[8] Davis UE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization[J]. Circ Res, 2005, 97(11):1093-1107.

[9] Yang M, Zhu M, Tang L, et al. Polymorphisms of TGFβ-1 and TGFBR2 in relation to coronary artery disease in a Chinese population[J]. Clin Biochem, 2016, 49(12): 873-878.

[10] Liu Z, Yang D, Xie P, et al. MiR-106b and MiR-15b Modulate Apoptosis and Angiogenesis in Myocardial Infarction[J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 29(5-6): 851-862.

[11] Liu X, Zhang Y, Du W, et al. MiR-223-3p as a Novel MicroRNA Regulator of Expression of Voltage-Gated K+ Channel Kv4.2 in Acute Myocardial Infarction[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(1): 102-114.

[12] Medici D, Potenta S, Kalluri R. Transforming growth factot-$\beta_2$ promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signaling[J]. Biochem, 2011, 437(3):

515-520.

[13] Olivieri F, Antonicelli R, Lorenzi M, et al. Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction[J]. Int J Cardiol, 2013, 167(2): 531-536.

[14] Lv P, Zhou M, He J, et al. Circulating miR-208b and miR-34a Are Associated with Left Ventricular Remodeling after Acute Myocardial Infarction[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(4): 5774-5788.

[15] Rui Z, Chao L, Hui P, et al. Expression of circulating miR-486 and miR-150 in patients with acute myocardial infarction[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2015, 15(1): 1-7.

[16] Xian L, Zhanwei F, Tianshu Z, et al. Plasma miR-1, miR-208, miR-499 as potential predictive biomarkers for acute myocardial infarction: An independent study of Han population[J]. Exp Gerontol, 2015, 72: 230-238.

[17] Cheng HY, Papp JW, Varlamova O, et al. microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment[J]. Neuron, 2007, 54(5): 813-829.

[18] Lukiw WJ. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus[J]. Neuroreport, 2007, 18(3): 297-300.

[19] Shi W, Du J, Qi Y, et al. Aberrant expression of serum miRNAs in schizophrenia[J]. J Psychiatr Res, 2012, 46(2): 198-204.

[20] 周依蒙，郑鹏翔，戴晓勇，等. 微小 RNA-678 调控心肌梗死相关转录因子 FoxP1 的表达研究[J]. 国际心血管病杂志, 2018, 45(1):4 4-47.

[20] Zhou Yimeng, Zheng Pengxiang, Dai Xiaoyong, et al. MicroRNA-678 regulates the expression of FoxP1, a transcription factor related to myocardial infarction[J]. International Journal of Cardiovascular Diseases, 2018, 45(1): 44-47.

[21] Ha JS, and Kim YH. A sporadic case of Loeys-Dietz syndrome type I with two novel mutations of the TGFBR2 gene [J]. Korean journal of pediatrics, 2011, 54(6):272-275.

[22] Jamsheer A, Henggeler C, Wierzba J, et al. A new sporadic case of early-onset Loeys-Dietz syndrome due to the recurrent mutation p.R528C in the TGFBR2

gene substantiates interind Ⅳidual clinical variability [J]. Journal of applied genetics, 2009,50(4):405-410.

[23] 刘艳华，李宾公．内皮间质转分化在心血管疾病中的研究进展[J].医学研究生学报,2016,29(8):872-876.

[23] Liu Yanhua, Li Bingong. Advances in the study of endothelial mesenchymal transition in cardiovascular diseases[J]. Journal of Medical Postgraduate, 2016, 29(8): 872-876.

[24] 马坤岭，刘晶，倪杰，等．微炎症致脂质稳态失调在小鼠心肌纤维化中的作用[J].中华心血管病杂志,2013,41(7):602-606.

[24] MA Kun-ling, LIU Jing, NI Jie, et al. The role of microinflammation-induced lipid homeostasis in myocardial fibrosis in mice[J]. Chinese Journal of Cardiovascular Diseases, 2013,41(7):602-606.

[25] 鞠延玲，朱国伟，赵旭，等. miR-330-5p 负性调控 ADAM17 基因抑制人心脏微血管内皮细胞的间质转化[J].贵州医药,2016,40(10):1011-1014.

[25] YAN Yan-ling, ZHU Guo-wei, ZHAO Xu, et al. Negative regulation of ADAM17 gene by miR-330-5p inhibits mesenchymal transition of human cardiac microvascular endothelial cells[J]. Guizhou Medicine, 2016, 40(10): 1011-1014.

[26] 史可欣，梅焕平．转化生长因子-β调控内皮间充质转化的研究进展[J].山西医药杂志,2017,46(5):522-526.

[26] Shi Kexin, Mei Huanping. Research progress of transforming growth factor-β in regulating endothelial mesenchymal transition[J]. Shanxi Medical Journal, 2017, 46(5): 522-526.

[27] Liu Z, Zhang K, Wang QL, et al. Serum TGF-β1 in patients with acute myocardial infarction[J]. Br J Biomed Sci, 2016, 73(2): 90-93.